

Brechwertmessungen an Diatomeen – Technik und neue Messungen

Peter Höbel

Beschäftigt man sich mit der Präparation und Einbettung von Diatomeen (Abb. 1 und 2), so treten zwangsläufig auch Fragen über Auflösung und Kontrastierung auf. Da der Kontrast direkt von der Differenz der Brechungsindizes zwischen Diatomeenschale und Einschlussmedium abhängt, ist eine nähere Betrachtung wünschenswert. Einschlussmedien können relativ einfach mit einem Refraktometer gemessen werden, wogegen Diatomeen durch Größe, Form und Material sich den üblichen Verfahren entziehen. Es geht in diesem Artikel darum, ein sicheres Verfahren zu beschreiben, was genaue, reproduzierbare und überprüfbare Werte liefert.

Der Brechwert von Diatomeenschalen wird in Literaturstellen mit Werten von 1,41 bis 1,43 beschrieben. Diese Angaben liegen etwas unter dem Brechwert von SiO_2 (Siliziumdioxid, Opal). Was aber bauen Kieselalgen außer SiO_2 noch in ihre Schale ein, was diesen Wert beeinflusst? Wie sicher sind überhaupt diese Messungen? Wer hat wann solche Messungen unter welchen Bedingungen angestellt? Der Fragenkatalog wurde immer länger, und so entschied ich mich zu eigenen Versuchsreihen.

Das Rad sollte nicht noch einmal erfunden werden und so prüfte ich zunächst die bekannten Methoden der Refraktionsmessungen für kleine Partikel in einem flüssigen Medium

- a) nach der Becke'schen Lichtlinie
- b) nach der Schroeder van der Kolk'schen-Methode.

Beide Methoden funktionieren an dünnen, ebenen Kristallplättchen mit Bruchkanten recht brauchbar. Diatomeenschalen zeigen aber eine absolut unbrauchbare Gestalt für diese Methoden, so dass nur sehr grobe Abschätzungen und wenig gesicherte Ergebnisse zu erzielen waren. Trotzdem gab es erste Hinweise, dass die in der Literatur genannten Refraktionswerte für Diatomeen nicht allgemeine Gültigkeit haben.

Grundgedanke zur Refraktionsmessung kleiner, durchsichtiger Partikel ist immer eine Immersionsmessung, bei welcher versucht wird, das Medium im Brechwert dem Brechwert der Partikel anzupassen. Ist das gelungen, so werden die feinen Partikel unabhängig von ihrer Form unsichtbar. Das flüssige Medium kann sodann mit einem herkömmlichen Refraktometer bestimmt werden. Es galt nun herauszufinden, mit welcher mikroskopischen Technik

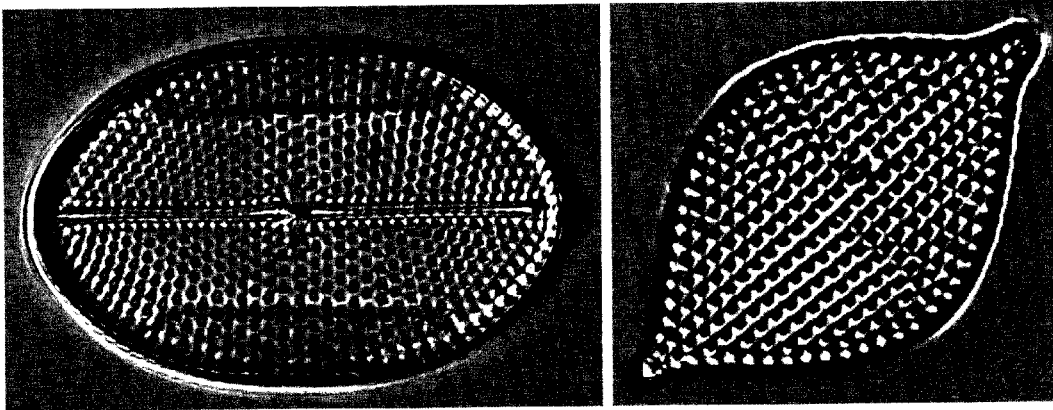


Abb. 1 und 2: Diatomeenschalen. – Abb. 1: *Mastogloia binotata*. – Abb. 2: *Raphoneis amphiceros*.

sich eine sichere Unterscheidung des Brechwertes (n) von $n_{\text{Medium}} > n_{\text{Partikel}}$ oder $n_{\text{Medium}} < n_{\text{Partikel}}$ erkennen lässt und wie eine Steigerung der Messgenauigkeit erfolgen kann.

Schnell zeigte sich der Phasenkontrast als hilfreich und sicher, gibt er doch die bekannten Halo-Effekte, welche unter anderem vom Brechwert abhängig sind. Der ganz große Vorteil liegt in der Intensitätsumkehr der Halo-Erscheinung, das heißt, an der Grenzlinie vom Medium zur Diatomeenschale kehrt sich der Hell-Dunkel-Verlauf um. Es stellte sich auch heraus, dass die Intensität beziehungsweise der Intensitätsverlauf der Halo-Erscheinung als wichtige Größe ausgewertet werden kann.

Für eine sehr exakte Messung reicht es nicht, den Umkehrpunkt zu finden, sondern es wird eine Messreihe mit nahe am Umkehrpunkt liegenden Medien gefordert, um dann mit mathematischen Methoden eine genaue Bestimmung des Brechungsindex zu finden.

Präparation der Diatomeen und Mikroskopaufbau

Die zu testenden, gereinigten Diatomeenschalen – meist in Wasser oder Alkohol aufbewahrt – werden als kleiner Tropfen auf ein Deckglas gegeben, dann unter leichter Wärme eingetrocknet und so vorsichtig am Deckglas fixiert. Nun legt man sehr sorgsam das Deckglas (Diatomeen nach unten) auf einen gereinigten Objektträger, als wolle man ein Präparat mit dem Medium Luft herstellen. Da das Deckglas nur

lose aufliegt, muss nun der Objektträger sehr vorsichtig auf den Mikroskoptisch gelegt werden. Jetzt erfolgt die Einstellung und Auswahl der zu messenden Diatomeenschale für alle weiteren Arbeitsschritte.

Das Mikroskop wurde zuvor mit allen Einstellungen für den Phasenkontrast gerüstet. Gut geeignet zeigt sich ein 40× Objektiv und eine Bestückung des Trinotubus mit einer Kamera zur Dokumentation. Als Lichtquelle dient eine weiße Power-LED mit bis zu 240 Lm. Die LED wird über eine Konstantstromquelle betrieben, um über längere Zeiträume eine konstante Beleuchtung zu garantieren.

Zur Dokumentation dient eine C-Mount-Kamera von ImagingSource DBK41AU02, welche über eine schnelle USB-Verbindung mit dem PC gekoppelt ist. Live-Bilder in Monitorgröße und eine komplette Steuerung über den PC erlauben ein rasches Arbeiten und Speichern der Bild-dokumente. Eine ganz wesentliche Forderung an die Kamera und die Steuersoftware ist ein unkomprimiertes Bild mit linearer Übertragung der Intensitätsinformation. Nur so kann eine Intensitätsauswertung der Halo-Erscheinung mit hoher Präzision gesichert werden. Die Datenspeicherung der Bilder erfolgt im BMP-Format.

Testmedien

Welche flüssigen Medien sind nun für die Untersuchung geeignet? Die Forderung zu Beginn war, an einer einzigen Diatomeenschale alle nötigen Messungen durchzuführen. Das heißt,

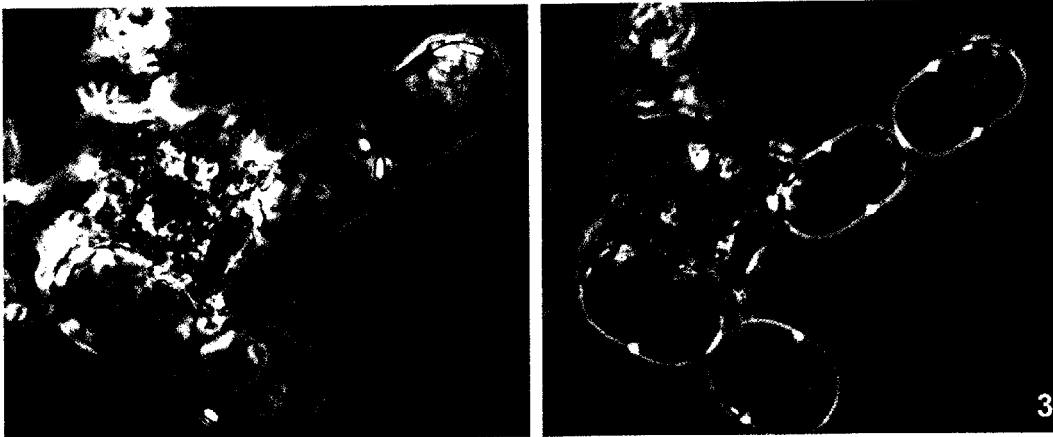


Abb. 3: *Melosira nummuloides*, im linken Bild in ein Medium mit Brechwert 1,4200 und im rechten Bild in ein Medium mit Brechwert 1,4785 eingebettet. Als Medium wurde eine Mischung aus Isopropanol und Toluol gewählt.

man soll nicht an unterschiedlichen Exemplaren messen und hinterher einen Mittelwert bilden, sondern an einer Schale alle Messungen durchführen und wichtige Vergleiche der Messungen verschiedener Exemplare hinterher anstellen.

Nach einigen Versuchen zeigte sich, dass es durchaus möglich ist, einen Tropfen einer Testsubstanz vorsichtig zwischen Objektträger und Deckglas einzubringen, ohne dass sich die Diatomeen verschieben oder verdrehen. Die Wärmefixierung lässt die Schalen soweit am Deckglas haften, dass das durchströmende Medium keine Störung verursacht.

Ein erster Gedanke war eine Wasser-Glycerin-Mischung (Brechwert n_D von Wasser = 1,3330, n_D von 99,95%igem Glycerin = 1,4735). Dieser Variationsbereich sollte reichen. Der erste Versuch scheiterte aber an der schlechten Benetzung der Diatomeenschalen durch Glycerin und weiter an der Tatsache, dass das Medium sich kaum wieder unter dem Deckglas entfernen ließ. So musste nach einem Gemisch mit höherem Dampfdruck und günstigen Brechwerten gesucht werden. Es fand sich in Isopropanol mit Toluol, was Brechwerte im Bereich von $n_D = 1,3772$ bis $n_D = 1,4969$ zulässt.

Je nach Dichte der Diatomeenverteilung unter dem Deckglas verdampft das Gemisch nach 5–20 Minuten, ausreichend Zeit für Aufnahmen und Auswertung, aber auch schnell genug für nachfolgende Messungen mit einem neuen Medium und somit neuen Brechwerten. Erst wenn mit Sicherheit die letzten Spuren der Mixtur verflüchtigt sind, kann eine neue Testsubstanz eingebracht werden. Es ist unwesentlich, mit welchem Brechwert man eine Testreihe beginnt. Wichtig aber ist es, dass unmittelbar vor jeder Messung an einem kalibrierten Refraktometer der Brechwert auf vier Nachkommastellen gemessen wird. Da der Brechungsindex von Flüssigkeiten stark temperaturabhängig ist, sollte das Mikroskop nahe beim Refraktometer stehen, um so eine annähernd gleiche Temperatur zu sichern.

Es ist zweckmäßig, in fünf bis zehn kleinen Gefäßen schon vorbereitete Gemische aus Isopropanol und Toluol zu erstellen und den Brechungsindex grob zu bestimmen. Da nur der exakte, nicht aber ein bestimmter Brechungsindex wichtig ist, macht diese Vorbereitung die Durchführung der Messreihe einfacher.

Aufnahme einer Messreihe

Nachdem alle Vorbereitungen getroffen sind, beginnt man vorsichtig einen Tropfen des Mediums mit direkt zuvor gemessenem, bekanntem Brechwert so an den Rand des Deckglases zu tropfen, dass dieser zwischen Deckglas und Objektträger gezogen wird. Hier ist etwas Übung erforderlich und vielleicht auch ein zweiter Tropfen.

Im Bild wird nach erneuter Scharfstellung der bekannte Halo-Effekt an der Grenzschicht zwischen Medium und Diatomeenschale erkennbar (Abb. 3). Es folgt die sofortige Bildaufnahme und Kennzeichnung für eine spätere Auswertung. Sehr entscheidend für eine hohe Messgenauigkeit ist, dass die Kamera im linearen Bereich arbeitet, also keine unter- oder überbelichteten Bildstellen erzeugt. Die Einstellung der Kamera oder Beleuchtungsintensität kann noch vor der ersten Aufnahme erfolgen.

Je nach Verlauf des Intensitätsprofils vom Medium zur Diatomeenschale (hell nach dunkel bei $n_{\text{Medium}} < n_{\text{Objekt}}$) wird die nächste Testsubstanz nach Verdunstung des Mediums ausgewählt und auf den Objektträger getropft. Es entsteht so eine Bildreihe mit unterschiedlichem Helligkeitsverlauf und einer Intensitätsumkehr (Abb. 4–7).

Auswertung einer Messreihe

Sind auf die beschriebene Weise mindestens drei, besser aber fünf oder mehr solcher Bild-dokumente auch mit einer Helligkeitsumkehr gespeichert, so kann die Auswertung des Helligkeitsprofils beginnen. Hierzu wird ein aus

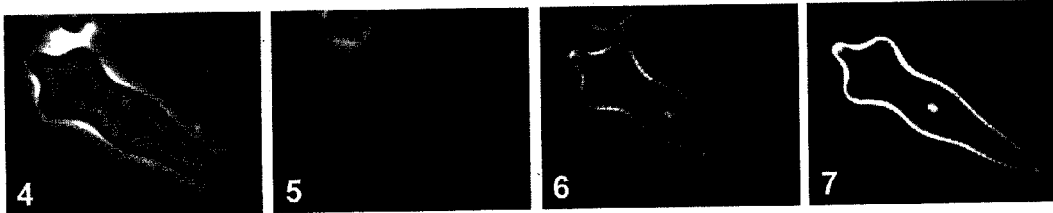
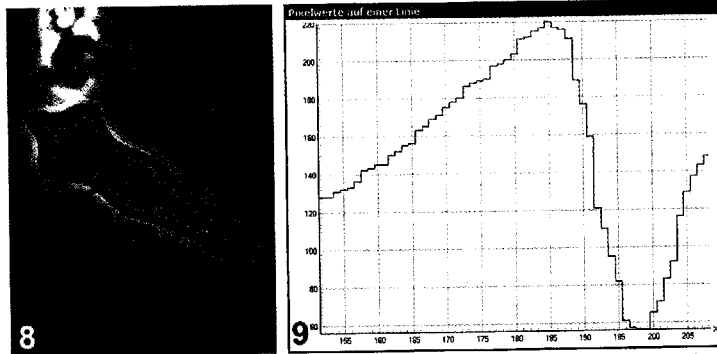


Abb. 4–7: *Gomphonema acuminatum* in Isopropanol und Toluol mit unterschiedlicher Mischung und somit auch unterschiedlichen Brechungsindices von $n_D = 1,4035$ (Abb. 4), $n_D = 1,4190$ (Abb. 5), $n_D = 1,4555$ (Abb. 6) und $n_D = 1,4766$ (Abb. 7).

Abb. 8: *Gomphonema acuminatum* in einem Medium mit $n_D = 1,4035$. Eingezeichnet ist eine Messlinie, welche durch das Programm FITSWORK in der Intensität ausgewertet wird. – Abb. 9: Intensitätsprofil der in Abbildung 8 markierten Linie in skaliertem, grafischer Form. Hieraus wird zwischen Maximum und Minimum der Intensitätssprung abgelesen.



dem Bereich der Astronomie bekanntes (free-ware) Programm mit dem Namen FITSWORK genutzt. Dieses Programm erlaubt es, in einfacher Weise ein Intensitätsprofil längs einer frei wählbaren Linie zu erstellen und den Intensitätsverlauf als Grafik abzuspeichern. In Abbildung 8 ist die Messlinie eingezeichnet, welche dann durch das Programm ausgewertet und in grafischer Form inklusive Skalierung dargestellt wird (Abb. 9). Interessant ist nur der Intensitätssprung von hell nach dunkel. Er beträgt im Beispiel $220 - 57 = 163$ Pixel für ein Medium mit $n_D = 1,4035$. Als Vereinbarung wird bei einem Verlauf von hell nach dunkel (vom Medium zum Diatomeenkörper) ein negativer Zahlenwert benutzt, das heißt, für diese Messung der Wert -163 . Somit ist das erste Zahlenpaar (-163 bei $n_D = 1,4035$) gefunden. Jetzt ist es sinnvoll, weitere Messungen an anderen Stellen dieser Kieselalge

vorzunehmen, um ein ausgewogenes Ergebnis zu erhalten. Wichtig ist, dass nur an solchen Stellen gemessen wird, wo die Kieselalge auch scharf abgebildet erscheint.

Wie viele Einzelmessungen erstellt werden müssen, hängt von der Streuung der Ergebnisse ab; Messungen sollten aber minimal an zwei Stellen erfolgen. Es gilt jetzt alle Bilddokumente auszuwerten, was immer ein Zahlenpaar aus Intensitätswert und Brechwert beinhaltet.

Berechnung des exakten Brechungsindex der Diatomeenschale

Hat man nun eine Zahlenkolonne aus 10 oder besser 20 Wertepaaren ermittelt, so erfolgt eine lineare Regressionsrechnung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate, ein von Carl Friedrich Gauß entwickeltes Verfahren, mit dem beliebige Wertepaare durch eine Linearkombination

Abb. 10: Mathematische Auswertung und grafische Darstellung der gewonnenen Messpunkte. Beim Helligkeitsverlauf „0“ kann der gesuchte Brechwert durch die Gerade ermittelt werden, beziehungsweise es wird der Wert der Konstanten nach der Regressionsrechnung abgelesen.

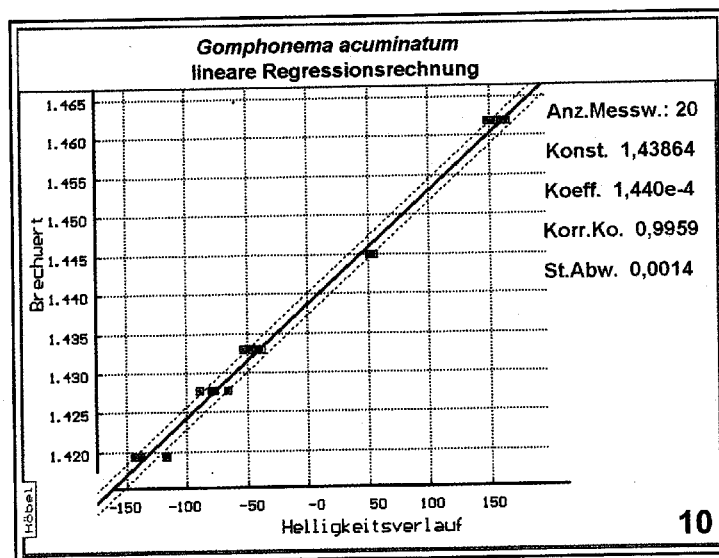


Tabelle 1: Brechwertmessungen verschiedener Diatomeenarten

Gemessene Diatomeen	Brechwert nD	Korrelations- koeffizient	Standard- abweichung	Anzahl der Messungen
<i>Amphipleura pellucida</i>	1,475	0,993	0,0048	13
<i>Bacillaria paxillifer</i>	1,465	0,992	0,0054	16
<i>Coscinodiscus marginatus</i> , fossil Newport-Beach CA	1,392	0,993	0,0021	16
<i>Fragilaria affinis</i>	1,443	0,998	0,0014	6
<i>Gomphonema acuminatum</i>	1,438	0,996	0,0014	20
<i>Melosira nummuloides</i>	1,447	0,997	0,0016	15
<i>Navicula lyra</i> , fossil Newport-Beach CA	1,408	0,968	0,0064	10
<i>Nitzschia sigma</i>	1,442	0,990	0,0058	17
<i>Pleurosigma angulatum</i> , Solequelle	1,463	0,997	0,0021	16
<i>Pleurosigma angulatum</i> aus Teneriffa	1,399	0,994	0,0040	14

approximiert werden können. Die Berechnung liefert nicht nur den gesuchten Brechwert, sondern auch eine Standardabweichung und den Korrelationskoeffizienten. Programme hierfür findet man in reicher Zahl im Internet.

In Abbildung 10 wird am Beispiel von *Gomphonema acuminatum* mit 20 Messungen und fünf unterschiedlichen Testmedien gezeigt, wie sich ein recht genauer Brechungsindex von $n_D = 1,439$ und einer Standardabweichung von 0,0014 ermitteln lässt. Da man den Brechwert für den Fall der Unsichtbarkeit der Diatomeenschale im Medium sucht, das heißt Helligkeitsverlauf = 0 und somit $n_{\text{Medium}} = n_{\text{Diatomeen}}$ ist der Wert für den Koeffizienten unwichtig und nur die Konstante mit 1,43864 entspricht dem gesuchten Brechungsindex. Ein Korrelationskoeffizient von $>0,9$ wird bereits als sehr hoch bezeichnet. Im Beispiel darf also von einer sehr exakten Messung ausgegangen werden, was auch durch die geringe Standardabweichung bestätigt wird.

Zusammenstellung gemessener Diatomeenschalen und Ausblick

Bereits die kleine Auswahl einiger gemessener Diatomeen (Tabelle 1) zeigt, dass es keinesfalls einen so engen Bereich der Brechungsindizes, wie er in der Literatur beschrieben wird, gibt, und dass sich dieses Ergebnis mit weiteren Untersuchungen noch ausweiten wird. Zudem ist der Brechungsindex stark davon anhängig, von welchem Fundort das Material stammt (Beispiel *Pleurosigma*). Es wird auch ersichtlich, wieso *Amphipleura pellucida* mit einem sehr hohen Brechwert oft als kontrastarm beschrieben wird.

In weiteren Untersuchungen mit Fluoreszenzbeobachtungen wurde auch sichtbar, dass gerade fossile Diatomeen teilweise stark fluoreszierende Stoffe mit in die Schale eingebaut haben. Vielleicht ergibt sich hier ein Zusammenhang mit dem geringeren Brechungsindex dieser Diatomeen.

Das vorgestellte Verfahren sollte grundsätzlich mit jedem Phasenkontrast-Mikroskop nachvollziehbar sein. Einziger kritischer Punkt ist die Dokumentation mit einer Digitalkamera. Nur wenige Kameras erlauben die volle Steuerung aller Parameter; wichtig sind die lineare Intensitätsübertragung und das Abschalten einer Komprimierung der Bilddaten. Viele Kameras für den astronomischen Sektor erfüllen jedoch diese Forderung in vollem Umfang. Zudem haben diese Kameras keinen mechanischen Verschluss und erzeugen keine Spiegel- oder Verschlussartefakte, welche bei diesen Vergrößerungen bereits zu Störungen führen können. Vielleicht regt dieser Beitrag die Neugier mancher Leser*an und trägt dazu bei, die Skala der Brechwerte bei Diatomeen noch zu erweitern.

Literaturhinweise

- Bertzen, G., Müller R.: Diatomeen: Präparation und Ökologie. Praktikumsskript der Ökologischen Station in der Jugendherberge Sorpese, 2002.
 Göke, G.: Moderne Methoden der Lichtmikroskopie. Franck'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart 1988.
 Meller, A.: Einschlußmittel mit hohem Brechungsindex für Diatomeen. Mikrokosmos 74, 55-60 (1985).
 Mütze, K.: ABC der Optik. Verlag Werner Dausien, Hanau/Main 1960.

Verfasser: Dipl. Ing. Peter Höbel, Im Föhrenwald 35, 91054 Erlangen, E-Mail: peter.hoebel@t-online.de, Internet: www.mikroskopie-ph.de